

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2003-500001  
(P2003-500001A)

(43)公表日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 12 N 15/09	ZNA	C 12 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 12 Q 1/68		G 01 N 33/50	P 4 B 0 2 4
G 01 N 33/50		C 12 N 15/00	ZNAA 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁)

(21)出願番号	特願2000-523375(P2000-523375)
(86) (22)出願日	平成10年11月27日(1998.11.27)
(85)翻訳文提出日	平成12年5月29日(2000.5.29)
(86)国際出願番号	PCT/GB98/03560
(87)国際公開番号	WO99/028500
(87)国際公開日	平成11年6月10日(1999.6.10)
(31)優先権主張番号	9725197.9
(32)優先日	平成9年11月29日(1997.11.29)
(33)優先権主張国	イギリス(GB)

(71)出願人	イギリス国 THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE IN HER BRITANNIC MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNETED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND イギリス国 ウィルシャー エスピーロージェイキュー ソールズベリー ポートンダウン ディーエスティーエル
(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】核酸の蛍光定量的検出システム

(57)【要約】

(a) 該標的核酸配列を含むと推測されるサンプルに、該標的配列に特異的なプローブ、およびDNA二重鎖結合剤を添加し、該プローブは、該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収できるあるいはそれに蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、(b) そのように形成された混合液を、標的核酸が増幅される増幅反応に供し、(c) 該サンプルを、該プローブが標的配列にハイブリダイズする条件に供し、および(d) 該サンプルからの蛍光をモニターすることからなる、サンプル中の標的核酸分子の存在を検出する方法。この方法は、例えばPCR反応のような増幅反応をモニターするのに利用でき、サンプル中に存在する標的配列の量を決定するともできる。さらにあるいは代わりに、増幅のモニタリングまたは多型性あるいは対立遺伝子変異の検出と定量化のための融解ヒステリシス情報のような、二重鎖不安定化データを生成するのにも利用可能であり、そのため一般的な診断にも有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 標的核酸配列を含むと推測されるサンプルに、DNA二重鎖結合剤、および該標的配列に特異的なプローブを添加し、該プローブは、該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収できるあるいはそれに蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、

(b) そのように形成された混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供し

(c) 該サンプルを、該プローブが標的配列にハイブリダイズする条件に供し、および

(d) 該サンプルからの蛍光をモニターすることからなる、サンプル中の標的核酸配列の存在を検出する方法。

【請求項2】 プローブを含む二重鎖の形成および不安定化に関連した蛍光が決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 反応性分子が該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収することが可能な受容体分子である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】 DNA二重鎖結合剤が挿入色素である、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項5】 段階(c)でのプローブへの結合以前に標的核酸が一本鎖化される、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項6】 増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項7】 増幅反応の各サイクル中にプローブが標的核酸とハイブリダイズする、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項8】 増幅サイクルの伸长期以外の期中にプローブが標的核酸とハイブリダイズする、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 サンプルからの蛍光が増幅反応を通してモニターされる、請求項7または請求項8に記載の方法。

【請求項10】 生成された蛍光データが反応中の供与体および受容体分子からの蛍光の相対的な量、またはプローブのハイブリダイゼーション率を決定す

るのに利用される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 蛍光データが、サンプル中に存在する標的核酸の量を定量化するのに利用される、請求項7から10のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項12】 色素と反応性分子の両方からの蛍光がモニターされる、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項13】 反応性分子がローダミン色素、C<sub>y</sub>5、またはフルオレセンスである、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項14】 反応性分子がプローブの末端領域に付着された、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項15】 プローブが増幅反応で利用されるDNAポリメラーゼによって加水分解されるように設計された、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項16】 プローブが標的配列から完全な形のまま遊離される、請求項1から14のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項17】 増幅反応が5' - 3' エキソヌクレアーゼ欠損酵素を利用して達成される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 プローブの3'末端が伸長期におけるその伸長を阻害するためにブロックされている、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項19】 (a) 核酸ポリメラーゼ、(b) 該標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な少なくとも一つのプライマー、(c) 蛍光DNA二重鎖結合剤、および(d) 該標的ポリヌクレオチド配列に結合可能で、該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収できる受容体分子を含むオリゴヌクレオチドプローブの存在下で、標的ポリヌクレオチドで核酸増幅を実施すること、および増幅反応中の蛍光の変化をモニターすることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】 増幅が一対の増幅プライマーを用いて適切に実施される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 核酸ポリメラーゼが適切には耐熱性のポリメラーゼである、請求項19または請求項20に記載の方法。

【請求項22】 さらなる段階において、ハイブリダイゼーションアッセイ

が実施され、配列に特徴的なハイブリダイゼーション条件が測定される、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項23】 条件が温度、電気化学ポテンシャル、または酵素あるいは化学薬品との反応である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 条件が温度である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 標的配列の対立遺伝子変異または多型性を検出するのに利用される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 ある配列の特徴を決定する方法であって、(a) 該配列を含むと推測されるサンプルに、該標的配列に特異的なプローブ、およびDNA二重鎖結合剤を添加し、該プローブは、該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収できるあるいはそれに蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、

(b) 該サンプルを、該プローブが標的配列にハイブリダイズする条件に供し、および

(c) プローブのサンプルへのハイブリダイゼーションまたはプローブと標的核酸配列間に形成される二重鎖の不安定化の結果としての蛍光変化をモニターし、特定の反応条件、該配列の特徴を決定することからなる、配列の特徴を決定する方法。

【請求項27】 該配列の反応条件の特徴が温度、電気化学ポテンシャル、または酵素あるいは化学薬品との反応である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 条件が温度である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 多型性または変異の存在を決定するために、二つの配列から得られた結果を比較する、請求項26から28のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項30】 DNA二重鎖結合剤が挿入色素である、請求項26から29のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項31】 反応性分子を含む標的ヌクレオチド配列に特異的なプローブ、および該反応性分子と適合するDNA二重鎖結合剤を含む、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法に利用されるキット。

【請求項32】 DNA二重鎖結合剤が挿入色素である、請求項31に記載

のキット。

【請求項33】 増幅反応に利用される一つあるいはそれ以上の試薬をさらに含む、請求項31または32に記載のキット。

【請求項34】 標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズする配列と反応性分子を含む、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法に利用されるプロープ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、例えば増幅反応を定量的にモニターすることによってサンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法、およびこれらの方法において利用するプローブとキットを提供する。この方法は多型性または対立遺伝子変異の同定に特に適切であり、よって診断法で使用され得る。

## 【 0 0 0 2 】

既知の蛍光ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）モニター技術は、いくつかの第二世代 P C R サーマルサイクリング装置で利用可能な、鎖特異的および一般的な D N A インターカレーター技術の両方を含む。

## 【 0 0 0 3 】

一般的な方法は、二本鎖 D N A 種に結合した時に増強された蛍光を示す D N A挿入色素を利用する。増幅中の D N A 濃度の上昇による蛍光増強は、反応の進行を測定するのに、および標的分子のコピー数を決定するのに利用できる。さらに、制御された温度変化に伴う蛍光をモニターすることにより、例えば P C R サーマルサイクリングの終了時点で、D N A 解曲線が作成できる。

## 【 0 0 0 4 】

一般的な D N A 法が核酸濃度の上昇をモニターするのに利用される場合、これらの過程は（以下で考察するいくつかの他の既知アッセイ法と比較して）時間的不利益を最小限にしてモニターすることができる。各反応の同じ時点で、単一の蛍光読み取り値が取得される。最終時点の融解曲線解析は、アンプリコンから人為的副産物を識別するのに、およびアンプリコンを識別するのに利用され得る。アガロースゲル電気泳動では可視化できない濃度についても、産物の融解ピークを決定することができる。

## 【 0 0 0 5 】

例えば複数のサンプルについて、高精度の融解データを得るためにには、5分間を要する既存のハードウェアで融解実験をゆっくりと実施しなくてはならない。しかし、蛍光増幅を連続的にモニターすることにより、融解とハイブリダイゼーションのヒステリシスの三次元像を作成することが可能となる。この三次元像は

アンプリコン依存的であり、産物の識別に十分な情報を提供し得る。

#### 【 0 0 0 6 】

一般的DNA融解曲線解析は、PCRサーマルサイクリングを最適化する際の強力な手段であることが見出された。アンプリコンの融解温度を決定することにより、後のPCRサイクルでの変性温度をこの温度まで下げる事が可能である。標的DNAよりもむしろ第一の反応産物からの増幅を最適化することで、後のサイクルで生じる人為的副産物の形成が減少する。プライマーオリゴヌクレオチドとその相補鎖の融解温度はそれらのアニール温度を決定するのに利用され、経験的な最適化の必要性を減少させる。

#### 【 0 0 0 7 】

しかし、一般的なインターラーカーテー法は準鎖特異的に過ぎず、それゆえ鎖特異的な検出が必要とされる場合はそれほど有効ではない。

#### 【 0 0 0 8 】

鎖特異的法は、増幅反応の進行をモニターするのにさらなる核酸反応成分を利用する。これらの方は、検出の基本として、蛍光エネルギー移動(FET)を利用することが多い。一つあるいはそれ以上の核酸プローブを蛍光分子で標識するが、そのうちの一つはエネルギー供与体として働くことができ、もう一方はエネルギー受容体分子である。これらは時として、それぞれレポーター分子およびクエンチャーモノマーとして知られる。供与体分子は励起スペクトラム範囲の光の特異的波長で励起され、引き続いて蛍光放出波長の範囲で光を放出する。受容体分子も、様々な距離依存性エネルギー移動メカニズムにより、供与体分子からエネルギーを受け取ることにより、この波長で励起される。起こり得る蛍光エネルギー移動の特別の例には、蛍光共鳴エネルギー移動または「FRET」がある。一般に、受容体分子と供与体分子が近接している時に(例えば、同じまたは隣接する分子上)、受容体分子は供与体分子の放出エネルギーを受け取る。蛍光エネルギー移動検出の基本は、供与体と受容体放出波長における変化をモニターすることである。

#### 【 0 0 0 9 】

FETまたはFRETプローブには通常用いられる二つのタイプがあり、受容

体から供与体を分離するために核酸プローブの加水分解を用いるものと、供与体と受容体分子の空間的関係を変化させるためにハイブリダイゼーションを利用するものである。

#### 【0010】

加水分解プローブは、TaqMan（登録商標）プローブとして市販されている。これらは、供与体および受容体分子で標識されたDNAオリゴヌクレオチドからなる。このプローブは、PCR産物の一方の鎖の特異的領域に結合するよう設計される。PCRプライマーがこの鎖にアニールした後、Taq酵素が5'から3'へのポリメラーゼ活性によりDNAを伸長する。TaqMan（登録商標）プローブは、Taq伸長の開始を防ぐために、3'末端がリン酸化で保護されている。もしTaqMan（登録商標）プローブが産物の鎖にハイブリダイズしているのならば、伸長するTaq分子がプローブを加水分解し、検出の基本として受容体から供与体を遊離する。この場合のシグナルは累積的であり、遊離の供与体と受容体分子の濃度は增幅反応の各サイクルで上昇する。

#### 【0011】

シグナルの生成がプローブの加水分解反応の発生に依存するという事実は、この方法に伴う時間的不利益が存在することを意味する。さらに、プローブの存在がPCR過程の円滑な操作を妨げることもあり得る。

#### 【0012】

さらに、特に例えば50サイクル以上というような多数回の增幅サイクルが必要な場合、加水分解が非特異的になり得ることが見出された。こうした場合、プローブの非特異的な加水分解は不適切に上昇したシグナルを生じてしまう。

#### 【0013】

このことは、そのような技術が、アイダホテクノロジーのRapidCycler（登録商標）およびLightCycler（登録商標）のような、ラピッドホットエアサーマルサイクラーの開発でより主要となってきた迅速PCR法とはうまく適合しないことを意味する。他の迅速PCR装置は、例えば同時係属英国特許出願第9625224.0号および9716052.7号に記述されている。従来のサーマルサイクリングと比較しての迅速サイクリングの利点は、他の

所で報告されている。そのような技術は、例えば、生命の危機または重篤な障害が避けられるならば、結果のスピードが重要である細菌戦争の検出システムに特に有用である。

## 【 0 0 1 4 】

さらに、シグナルの生成は概してアンプリコンの融解温度よりもむしろプローブの加水分解に依存するため、加水分解プローブは融解のヒステリシスに関する重要な情報を提供しない。

## 【 0 0 1 5 】

米国特許第5,491,063号では、DNA結合剤による標識一本鎖オリゴヌクレオチドからのシグナルの修飾を基にした、蛍光性標識プローブの溶解状態でのクエンチング方法を記述している。ポリメラーゼ連鎖反応中のプローブ切断(加水分解)に続くプローブ鎖長の減少の結果として起こるこのシグナルの差は、標的核酸の存在を検出手段を提供することを示唆している。

## 【 0 0 1 6 】

ハイブリダイゼーションプローブは、数多くの型式のものが利用可能である。分子ビーコンは、ヘアピンループを形成するような相補的な5'および3'配列を有するオリゴヌクレオチドである。末端の蛍光標識は、ヘアピン構造が形成されるためにFRETの近接にある。分子ビーコンの相補的配列へのハイブリダイゼーションに続き、蛍光標識は分離され、そのためFRETは生じず、これが検出の基本を成す。

## 【 0 0 1 7 】

標識オリゴヌクレオチドの対合も利用可能である。これらはPCR産物の鎖上で近接してハイブリダイズし、供与体および受容体分子と一緒に運び、そのためFRETが生じ得る。増強されたFRETが検出の基本となる。このタイプの変種には、標識増幅プライマーと単一の近接するプローブの利用が含まれる。

## 【 0 0 1 8 】

二つのプローブ、または二つの標識分子を含む分子ビーコンタイプの使用は、その過程に伴うコストを増やす。さらに近接して特異的に結合するに十分な長さの二つのプローブを知るため、この方法では合理的な長さの既知配列の存在が必要

要となる。これはある診断応用で問題となり得り、例えばHIVウイルスのように、有効なプローブを設計するのに使用されうる生物体で保存されている配列の長さが比較的短い場合である。

## 【 0 0 1 9 】

さらに、対合するプローブの利用は、より複雑な実験設計を含む。例えば、プローブの融解によって生じるシグナルは、両方のプローブの融解作用によるものである。小さなミスマッチまたは一方のプローブがスプライス領域にかかって結合する必要がある場合（例えば、イントロンの両側の配列がプローブ部位として利用可能な場合に、サンプル中のDNAと比較してRNAを検出するため）の研究では、もう一方のプローブが先に融解するならば、不正確な結果を生じることになり得る。

## 【 0 0 2 0 】

米国特許第4,868,103号では、分析物の存在を検出するFRETシステムについて一般的な見地から記述しており、そこでは供与体分子として挿入色素を利用している。その過程は、增幅段階を含まない。

## 【 0 0 2 1 】

出願人は、特定の核酸配列の存在を検出するための鎖特異的システムを開発した。

## 【 0 0 2 2 】

本発明は、

( a ) 標的核酸配列を含むと推測されるサンプルに、DNA二重鎖結合剤、および該標的配列に特異的なプローブを添加し、該プローブは、該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収できるあるいはそれに蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、

( b ) そのように作成した混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供し、

( c ) 該サンプルを、該プローブが標的配列にハイブリダイズする条件に供し、および ( d ) 該サンプルからの蛍光をモニターすることからなる、サンプル中の標的核酸分子の存在を検出する方法を提供する。

## 【 0 0 2 3 】

この明細書の中で用いる場合、「DNA二重鎖結合剤」という表現は、二重鎖型のDNAに付着するあるいはそれ自身を二重鎖型のDNAに会合させるいずれかの物質を意味する。これらには、当分野で周知である挿入色素が含まれる。

#### 【 0 0 2 4 】

段階(c)でプローブが標的配列にハイブリダイズする時、挿入色素のようなDNA二重鎖結合剤は鎖間にトラップされる。一般に、これにより色素に関連した波長での蛍光が上昇する。しかし、反応性分子が色素から蛍光を吸収できる場合(例えば、それは受容体分子である)、それはFET、特にFRETにより色素から放出エネルギーを受け取り、そのためその特有の波長において蛍光を放出する。受容体分子からの蛍光の上昇は、色素での場合とは異なる波長のものであり、二重鎖型でのプローブの結合を示す。プローブを含む二重鎖の形成あるいは不安定化を示す蛍光の変化は、好ましくは段階(d)でモニターされる。同様に、反応性分子が色素に蛍光を与えることができる場合(例えば、それは供与体分子である)、供与体分子からの放出はFRETの結果として減少し、この減少が検出され得る。色素の蛍光は、これらの状況下では予想よりもさらに上昇する。

#### 【 0 0 2 5 】

シグナルがより容易に検出可能であるため、好ましくは反応性分子は受容体分子である。

#### 【 0 0 2 6 】

挿入色素のようなDNA二重鎖結合剤と単独に標識されたプローブを利用するることは、これらの成分が二重に標識されたプローブが必要な他のアッセイ法と比較して非常に経済的であるという点で有利である。ただ一つのプローブを利用することにより、プローブの基礎を形成するのに必要な既知の配列の長さは比較的短くても良く、そのため困難な診断状況においてさえもこの方法は利用可能となる。

#### 【 0 0 2 7 】

さらに、本発明の方法は、その応用面において非常に用途が広い。この方法は、この明細書の中で後に記述するように、サンプル中の標的核酸配列に関して定量的および定性的データの両方を生成するのに利用できる。特に、本発明は定量

的增幅のために提供するだけでなく、さらにあるいは代わりに、二重鎖不安定化温度または融解点のような特徴あるデータを得るためにも利用可能である。

#### 【 0 0 2 8 】

本発明の方法では、増幅反応中または完了した後に、プローブがサンプルにハイブリダイズする条件にサンプルを供す。それゆえこの過程により、検出は、最初に全試薬を添加した一つの容器内で増幅とモニタリングが実施可能な、均一な方法で達成される。その後の試薬の添加段階は必要としない。固体支持体の存在下での（これは選択であるが）この方法の達成も必要とされない。

#### 【 0 0 2 9 】

プローブはDNAあるいはRNA等の核酸分子を含んでもよく、これらは後者が一本鎖の形である時、標的核酸配列にハイブリダイズしうる。この場合、段階(c)は標的核酸を一本鎖にする条件での使用を含んでよい。

#### 【 0 0 3 0 】

プローブは溶液内で遊離しているか、固相支持体、例えば産物を分離するのに有用な磁気ビーズ等のビーズの表面、あるいは表面プラズモン共鳴検出器の導波管等の検出装置の表面に固定化するかどちらでもよい。選別は注目される特定のアッセイおよび使用されている特定の検出手段の性質に依存しうる。

#### 【 0 0 3 1 】

とりわけ、使用される増幅反応は、サンプルに存在する標的核酸配列のいくつかが一本鎖になる条件にサンプルを供する段階を含みうる。このような増幅反応はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)あるいはリガーゼ連鎖反応(LCR)を含むが、好ましくはPCR反応である。

#### 【 0 0 3 2 】

プローブが、適当なハイブリダイズ条件を使用すれば、増幅反応の過程の間にハイブリダイズすることが可能である。

#### 【 0 0 3 3 】

好ましい実施様態において、プローブは増幅のそれぞれのサイクルの間でこれらの条件を満足するように設計されてよい。したがって増幅反応のそれぞれのサイクルの間のいくつかの時点で、プローブは標的配列にハイブリダイズし、プロ

ープと標的配列間でとらえられる挿入色素のようなDNA二重結合剤の間に、FETあるいはFRETの結果としてのシグナルを生成する。增幅が進むにつれ、プローブは標的配列から分離し、あるいは融解しそれにより生成されるシグナルは減少するだろう。したがって增幅のそれぞれのサイクルにおいて、反応性分子からの蛍光ピークが生成される。ピークの強度は、より多くの標的配列がプローブの結合に有用になるので增幅が進むにつれ増加するであろう。

## 【 0 0 3 4 】

それぞれのサイクルの間のサンプルからの反応性分子の蛍光をモニタすることにより、增幅反応の進行が様々な方法でモニターできる。例えば、融解ピークによって提供されたデータは解析でき、また例えば融解ピーク下面積を計算し、このデータをサイクルの番号に対してプロットすることで解析できる。

## 【 0 0 3 5 】

例えば、蛍光は既知の蛍光計を用いて適切にモニターできる。例えば光電子倍管電圧の形成におけるこれらからのシグナルを、データ処理装置ボードに送り、それぞれのサンプルチューブに関連するスペクトルに変換した。多くのチューブ、例えば96チューブを同時に評価することができる。データを反応の間中、頻繁な間隔、例えば10分間ごとに1回、このように収集してよい。

## 【 0 0 3 6 】

それぞれのシグナル部分を（すなわち色素および／または反応分子）代表するピークを形成するために、このように生成されたスペクトルを、例えば先に選択した色素の「適合」を用いて分離できる。ピーク下面積をそれぞれのシグナルについて強度値を表しているかどうかを決定でき、もし必要ならば、お互いの比率として示すことができる。シグナルの強度および／または比の差異は、反応を通してあるいは温度等の異なる反応条件で記録されたFRETを変化させるだろう。上記で概要を述べたようにこの変化はプローブと標的配列間の結合事象に関連する。異なるピーク下面積の総体はFRET効果に対する強度値を計算すること許容するだろう。

## 【 0 0 3 7 】

このデータはサンプルに存在する標的核酸の量を定量する機会を提供する。

## 【 0 0 3 8 】

加えて、プローブハイブリダイズの速度論は標的配列の濃度の定数項での決定を与えるだろう。サンプルからの蛍光の変化は、サンプルへのプローブのハイブリダイズの速度を計算することを許容しうる。ハイブリダイズ速度の増加はサンプル内に存在する標的配列の量に関連するだろう。標的配列の濃度が增幅反応が進むにつれて増加するので、プローブのハイブリダイズはさらに迅速に起こるだろう。したがってこのパラメーターはまた定量化の基礎として使用できる。このデータ処理の様式は、情報を提供することがシグナル強度に依存してはいないときには有用である。

## 【 0 0 3 9 】

好ましくは色素と反応性分子両方の蛍光をモニターし、放射の間の関係を計算した。これは色素からの蛍光を測定することで提供された一般的なDNA情報を補足するための鎖特異的測定を提供する。このように、非特異的增幅のシグナルへの寄与は区別でき、したがってこの方法は、内部チェックを提供する。

## 【 0 0 4 0 】

適切な反応性分子はローダミン色素あるいはCy5やフルオレセイン等の他の色素である。これらは従来の様式でプローブへ付着してよい。プローブに沿った反応性分子の位置は、一般的ではあるけれども重要ではなく、それらはプローブの末端領域に位置しうる。

## 【 0 0 4 1 】

挿入色素は当分野でよく知られている。これらはたとえば、SYBR Green I、SYBR Gold、臭化エチジウム、YOPRO-1等のサンプルSYBR Greenを含む。

## 【 0 0 4 2 】

FRET等のFETに対して反応性分子と色素の間に発生するために、(プローブ上の挿入色素あるいは反応性分子のどちらかであってよい)供与体の蛍光放射は、受容体(たとえば他の色素あるいは反応分子)より波長が短くなければならない。

## 【 0 0 4 3 】

したがって適切な組み合わせを以下の表で記述する。

【 0 0 4 4 】

【 表 1 】

色素	受容体／供与体	反応性分子	受容体／供与体
SYBRGold	供与体	ローダミン	受容体
SYBRGreen I	供与体	ローダミン	受容体
SYBRGold	供与体	Cy 5	受容体
SYBRGreen I	供与体	Cy 5	受容体
臭化エチジウム	受容体	フルオロセイン	供与体

好ましくは、供与体および／または受容体として使用される分子は鋭いピークを生成し、放射の波長にほとんどあるいは全く重複部がない。これらの状況下、DNA二重結合剤シグナルから鎖特異的なピークをのぞくことが必要ではない。

(たとえば反応性分子によって提供された) 鎖特異的シグナルのみの簡単な測定は、標的反応に起因するFRETの程度に関する情報を提供するだろう。臭化エチジウム／フルオロセインの組み合わせはこの要求を満たすことができる。この場合、鎖特異的反応は520 nmでの蛍光の減少によって定量性であり、1／蛍光として適切に表された。

【 0 0 4 5 】

しかしながら、供与体および受容体分子からの蛍光シグナルにおいて特異的なスペクトル重複部が存在する場合、結果として、たとえばスペクトル間の関係を経験的に決定することおよび2つのシグナルからのシグナルを標準化するためにこの関係を使用することで説明されうる。

【 0 0 4 6 】

プローブを、增幅反応で使用しそれにより反応性分子を放出するDNAポリメラーゼによって加水分解されるように設計することが可能である。これは、それぞれのサイクルで増加している系に存在する遊離の反応性分子の量とともに累積シグナルを提供する。この型の累積シグナルは特に標的配列の量が定量される場合、好ましい可能性がある。しかしながら、シグナルはプローブの解離に単に依

存しないのでこのように消費されることはプローブにとってこのアッセイで必要ではない。

#### 【 0 0 4 7 】

反応のそれぞれの段階で存在する増幅産物の量に直接関連し、および／または例えば急速 P C R において反応の速度が最も重要である場合の十分に反転可能なシグナルを得るために、プローブを標的配列からそのままの形で放出されるよう設計することが好ましい。これは、例えば増幅反応の伸長段階の間であってよい。しかしながら、シグナルはプローブの加水分解に依存しないので、プローブは反応のアニーリングまたは融解相を含む増幅サイクルの間のいずれかの段階において標的配列から加水分解され融解するように設計してよい。このようなプローブは増幅反応阻害を最小限にすることを保証するであろう。

#### 【 0 0 4 8 】

伸長段階の間に結合するプローブを使用すると、それらの標的配列からのそのままの形のプローブの放出が、T a q あるいはP w o のストッフル ( S t o f f l e ) 断片等の5' - 3' エキソヌクレアーゼ欠損酵素を用いることで成し遂げられる。

#### 【 0 0 4 9 】

本反応、あるいは確かにいくつかの増幅反応の伸長段階の間プローブが伸長しないことを保証するため、プローブの3' 末端を適切にはリン酸化によってプロックできる。

#### 【 0 0 5 0 】

そこでプローブは再び反応に加わり、そしてプローブの経済的な適用を表す。

#### 【 0 0 5 1 】

このように生成されたデータは様々な方法で解釈されうる。最も簡単な形では、増幅反応の最中あるいは終了時の受容体分子の蛍光の増加が、存在する標的配列の量の増加を示し、増幅反応が進み、したがって標的配列がサンプル内に実際存在するという事実を示唆する。しかしながら、上記で概要したように、定量はまた増幅反応の間中にモニターすることにより可能である。加えてD N A二重結合剤とりわけ挿入色素からの放射をサンプル内の核酸の大量の上昇をモニターす

るために使用でき、これは反応性分子と色素シグナル間の関係によって測定されるような鎖特異的増幅と比較できる。最終的にさらに以下で議論するであろうような配列についての情報を得るために、終了時点での測定あるいは最中の測定いずれかの特性化データおよびとりわけ融解点解析を得ることは可能である。

#### 【 0 0 5 2 】

従って本発明の好ましい実施様態は、(a) 核酸ポリメラーゼ、(b) 少なくとも1つの前記標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズできるプライマー、(c) 蛍光DNA二重結合剤、および(d) 前記オリゴヌクレオチド配列に結合できる、また前記色素からの蛍光を吸収できるオリゴヌクレオチドプローブの存在下、標的ポリヌクレオチド上で核酸増幅を行うこと、および増幅反応の間の蛍光の変化をモニターすることを含む、核酸増幅を検出するための方法を含む。

#### 【 0 0 5 3 】

すでに述べたように、DNA二重結合剤は適切には挿入色素である。増幅は、DNA鎖内の標的ヌクレオチド配列のみを当分野でよく理解されているように増幅するように設計したプライマーの組を用いて適切に行われる。核酸ポリメラーゼは適切にはTaqポリメラーゼのような熱耐性ポリメラーゼである。

#### 【 0 0 5 4 】

増幅反応を行うことができる適切な条件は当分野でよく知られている。最適条件は、含有した特定のアプリコン、使用したプライマーの特性、利用した酵素に依存しているそれぞれの場合で可変であってよい。最適条件は当業者によってそれぞれの場合で決定されてよい。典型的な変性温度は95°Cのオーダーであり、典型的なアニーリング温度は55°Cのオーダーであり、伸長温度は72°Cのオーダーである。

#### 【 0 0 5 5 】

本方法は特定の配列の特性を決定するためのハイブリダイズアッセイで用いることができる。

#### 【 0 0 5 6 】

したがって、さらなる態様において、本発明は以下の

(a) 前記配列を含むことが予期されるサンプルに、DNA二重結合剤および

前記標的配列に特異的なプローブを添加し、前記プローブは前記DNA二重結合剤からの蛍光を吸収できあるいは前記DNA二重結合剤への蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、

( b ) 前記サンプルを、前記プローブが標的配列にハイブリダイズする条件に供し、

( c ) あるプローブのサンプルへのハイブリダイズあるいはプローブと標的核酸配列間で形成される二本鎖の不安定化の結果としての蛍光変化をモニターとして、特定の反応条件、前記配列の特性を決定することを含む、配列の特性を決定するための方法を提供する。

#### 【 0 0 5 7 】

適切な反応条件は温度、電気化学、あるいは特定の酵素あるいは化学薬品の存在に対する反応を含む。これらの特性が変化する時の蛍光の変化をモニターすることによって、配列の正確な性質の特性化の情報が得られる。例えば、温度の場合、プローブが分離し、標的配列から「融解する」時の温度が決定できる。これは例えば遺伝子診断での対立遺伝子変異を含む配列の多形性を検出し、所望なら定量するためにかなり有用でありうる。「多形」は転位、トランスバージョン、挿入、とりわけ自然界で起こる可能性のある逆位配列の欠失を含む。

#### 【 0 0 5 8 】

プローブの融解のヒステリシスはもし標的配列がたった1塩基対が変化しただけで異なるであろう。したがって、サンプルが单一対立遺伝子変異体のみを含む場合、プローブの融解の温度は他の一つの対立遺伝子変異体のみを含むサンプルで見つかったものと異なる可能性がある。サンプルは、それぞれの対立遺伝子変異体に対応する融解点を示す両対立遺伝子変異体を含んでいる。

#### 【 0 0 5 9 】

同様の考慮を、電気化学的性質の観点から、またはある酵素あるいは化学薬品の存在下で適用する。プローブは電気化学的電位が適用されてもよい固体表面上に固定化されてよい。標的配列は、配列の正確な特性に依存した特定の電気化学的値において、プローブと結合するかあるいはプローブから拒絶されるだろう。

#### 【 0 0 6 0 】

この実施様態は上記で言及したPCR反応のような增幅反応と関連して達成でき、または個々に使用してよい。かさねて反応分子は望ましくは受容体分子である。

#### 【0061】

本発明のさらなる態様は本発明の方法で用いるキットを含む。これらのキットは反応性分子を含む標的ヌクレオチド配列に特異的なプローブを含むだろう。さらにこれらは前記反応性分子でFETあるいはFRETを行うことができるという点で相容性がある挿入色素等のDNA二重結合剤を含んでよい。このキットの他の可能性のある成分はDNAポリメラーゼ等の増幅反応に使用した試薬を含む。

#### 【0062】

本発明は今、以下の付随する図を参照して実施例によって詳しく記述する。

#### 【発明の実施の形態】

図1Aは一本鎖DNA(2)の存在下、PCR反応の融解相の間に発見されたような挿入色素(1)の作用を例示する。色素はあるレベルでDNA鎖および蛍光に付着する。しかしながら、DNAが二本鎖(3)になった時、色素が濃縮し、蛍光がかなり増加する。この蛍光の増加は二本鎖DNAの形成を検出するのに使用できる。色素の蛍光はたとえばスペクトルの緑色の領域での特定の波長である。

#### 【0063】

本発明に従ったプローブ(4)上の挿入色素(1)の効果を図1Cに例示した。いくつかの色素はプローブのヌクレオチドに結合し、バックグラウンドレベルで蛍光を発することができる。しかしながら、FRETの結果、いくつかのエネルギーは矢印で指し示したような受容体分子(5)へ移り、そしてこの分子はまたたとえばスペクトルの赤色領域でのこの色素の波長とは異なる波長で蛍光を発することができる。

#### 【0064】

プローブが図1Dで例示したように一本鎖標的配列にハイブリダイズする時、色素からの蛍光エネルギーの増加がしたがってより高いレベルで蛍光を発する受

容体分子(5)へ移る。受容体分子の蛍光の増加がしたがって標的配列へのプローブのハイブリダイズを示すことができる。したがって受容体分子の蛍光の増加を測定することで、たとえば温度減少としてハイブリダイズが起こる点を検出できる。同様に受容体蛍光の減少はプローブが標的配列から融解する温度における温度低下として起こる。これはプローブと標的配列のハイブリダイズ特性に依存して変化するだろう。たとえば、標的配列に完全に相補的なプローブは標的配列とハイブリダイズするが一つ以上のミスマッチを含んでいるプローブとは異なる温度で融解するであろう。

## 【0065】

図2は本発明の方法がPCR反応等の增幅反応においてどのように使用されるかを例示した。プローブ(4)は挿入色素(1)と関連して一本鎖DNAにハイブリダイズでき、したがって増加した受容体シグナルを生成する(図2A)。これはサイクルのアニーリング相の間で起こりうる。標的配列の量が增幅の結果として増加したように、シグナルはこれも増加しうる受容体分子によってアニーリング相の間に生成された。

## 【0066】

伸長段階の間、プローブは加水分解あるいは例示したようにDNAポリメラーゼによって標的配列から排除される。この点で、色素(1)からのシグナルが増強され、標的配列の量の増加を再表示するとはいえ受容体シグナルが減少する。

## 【0067】

本様式での增幅反応の進行をモニターすることで、もともとのサンプルで存在する標的配列の量を定量できる。

## 【0068】

## 実施例1

PCR增幅反応

PCR反応混合物は以下の試薬を含み、作用濃度を調製した。

1×天然PCR緩衝液 (3 mM Mg<sup>++</sup>、Bio/Gene, Bio/Gene House, 6 The Business Centre, Harvard Way, Kimbolton, Cambridge, PE18 0NJ, U

K)、Taq DNA ポリメラーゼ 0.025 単位/ $\mu$ l、および dNTP's PCR ヌクレオチド 200  $\mu$ M (Boehringer Mannheim UK (Diagnostic & Biochemical) Limited, Bell Lane, Lewes, East Sussex, BN7 1LG, UK)。それぞれ 1  $\mu$ M の外注オリゴヌクレオチドプライマー (Crucachem Ltd, Todd Campus, West of Scotland Science Park, Acre Road, Glasgow G20 0UA, UK)。プラスミドDNAを最終濃度 10 fg/ $\mu$ l (~3000 コピー) で加えた。陰性対照実験において、同様のPCRをプラスミドDNAが存在しない状態で行った。

## 【0069】

フォワード YPPA155 (dATGACGCAGAAACAGGAAGAAAGATCAGCC) およびリバース YPP229R (dGGTCAGAAATGAGTATGGATCCCCAGGATAT) プライマーがペスト菌 (*Yersinia pestis*) の抗凝固酵素遺伝子の 104 bp アンプリコンを選択した。これはファージミド構築物 pYP100ML を形成するためにすでに pBluescript SK ベクター (Stratagene Europe, Hoge hillweg 15, 1101 CB Amsterdam, Zuidooost, The Netherlands) 内にクローン化されている。

## 【0070】

蛍光プローブ (5' (CY5) CGCTATCCTGAAAGGTGATATACTCTGG、Bio/Gene、Bio/Gene House, 6 The Business Centre, Harvard Way, Kimbolton, Cambridge, PE18, ONJ, UK) を 0.2 M の最終濃度に添加した。Syber Gold DYE (Molecular Probes) を参考濃度の 1 : 400, 000 の最終濃度で加えた。

## 【0071】

反応を複合ガラスキャピラリーおよび Idaho Technology L

light cycler (Bio/Gene, Bio Gene House, 6 The Business Centre, Harvard Way, Kimbolton, Cambridge, PE18 0NJ, UK) にて温度循環させた。サイクルは95°Cで1秒間、55°Cで1秒間、74°Cで1秒間であった。

## 【0072】

温度循環に続いて、融解実験を0.1°C／秒での55°Cから95°Cまで行った。反応をLight Cycler<sup>TM</sup>を用いて光学的に調べ、520 & 670 nmでの蛍光放射を記録した。

## 【0073】

温度(T)に対する蛍光の差異(F)関数dF/dFをY軸に温度に対してプロットした結果を図3にしめす。520 nmにおいてSyber Goldからの蛍光のみが記録された。明らかなピークが、PCR反応にて増幅された特定の産物の融解温度と関連した。陰性対照は人工物のみを示した。

## 【0074】

670 nmにおいてCY5受容体分子からのシグナルと、Syber Goldからのシグナルの両方が記録された。特定増幅産物のピーク表示が陽性実験で観察されたが、人工物のみを再び示している陰性対照ではみられなかった。しかしながら、この場合においてさらに、プローブの融解による明らかなピークが陽性実験で確認された。

## 【0075】

実施例2

以下の材料を使用した。

オリゴヌクレオチド：

プローブ：5' (CY5) CGCTATCCTGAAAGGTGATATACTGGGAGA 3'

相同物：5' TCCCCAGGATATATCACCTTTCAGGATAGCG 3'

ミスマッチ1：5' TCCCCAGGATATATCAGCTTTCAAGGATA

G C G 3 '

ミスマッチ2 : 5' T C C C A G G A T A T A T C A G G T T T C A G G A T A

G C G 3 '

ミスマッチ3 : 5' T C C C A G G A T A T A T C T T T C A G G A T A G C G

3 '

( Bio / Gene Limited、Bio / Gene House、6 The Business Centre、Harvard Way、Kimbolton、Cambridgeshire、PE18 0NJ )

挿入物 :

S Y B R Green I (Molecular Probes)

ハイブリダイズ緩衝液 :

P C R M O 0 1 2 ( Bio / Gene Limited、Bio / Gene House、6 The Business Centre、Harvard Way、Kimbolton、Cambridgeshire、PE18 0NJ )

蛍光観測器 :

I d a h o T e c h n o l o g y L C 3 2 ( Bio / Gene Limited、Bio / Gene House、6 The Business Centre、Harvard Way、Kimbolton、Cambridge、PE18 0NJ )

方法 :

4 μl ハイブリダイズ混合液を以下からなるように作成した。

P C R M O 1 2 : 製造者の規定した作用濃度

S Y B R Green I : 参照溶液の 1 / 20, 000 濃度

プローブオリゴヌクレオチド : 100 μM

標的オリゴヌクレオチド : 100 μM

ハイブリダイズ混合液を Light Cycler で以下の温度レジメにかけた。  
20 °C / 秒で 95 °C まで熱し、20 °C / 秒で 50 °C まで冷やし、10 秒間 50 °C に保持し、0.1 °C / 秒で 80 °C まで熱した。蛍光を最終加熱工程中ゲインを

16にセットしたF1(520nm - 580nm)、ゲインを128にセットしたF2(650nm - 690nm)の2周波でモニターした。

【 0 0 7 6 】

S Y B R G r e e n I から F 2 へのスペクトルの重複を以下の経験的に決められた関数 F 2 重複 = 0.3232 × F 1 + 4.2853 を用いて F 2 から除去した。F 2 の S Y B R G r e e n I 依存成分を標準化し、図 4 に示すように X 軸の温度に対して Y 軸にプロットした。結果は標的にした配列の特性のプローブ解離温度の依存を示す。標的化配列の単一塩基の相違をはっきりと区別できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】

図 1 は本発明の工程で利用する相互作用を図的に示す。

【 図 2 】

図 2 は本発明に従った增幅反応の間の工程を図示する。

【 図 3 】

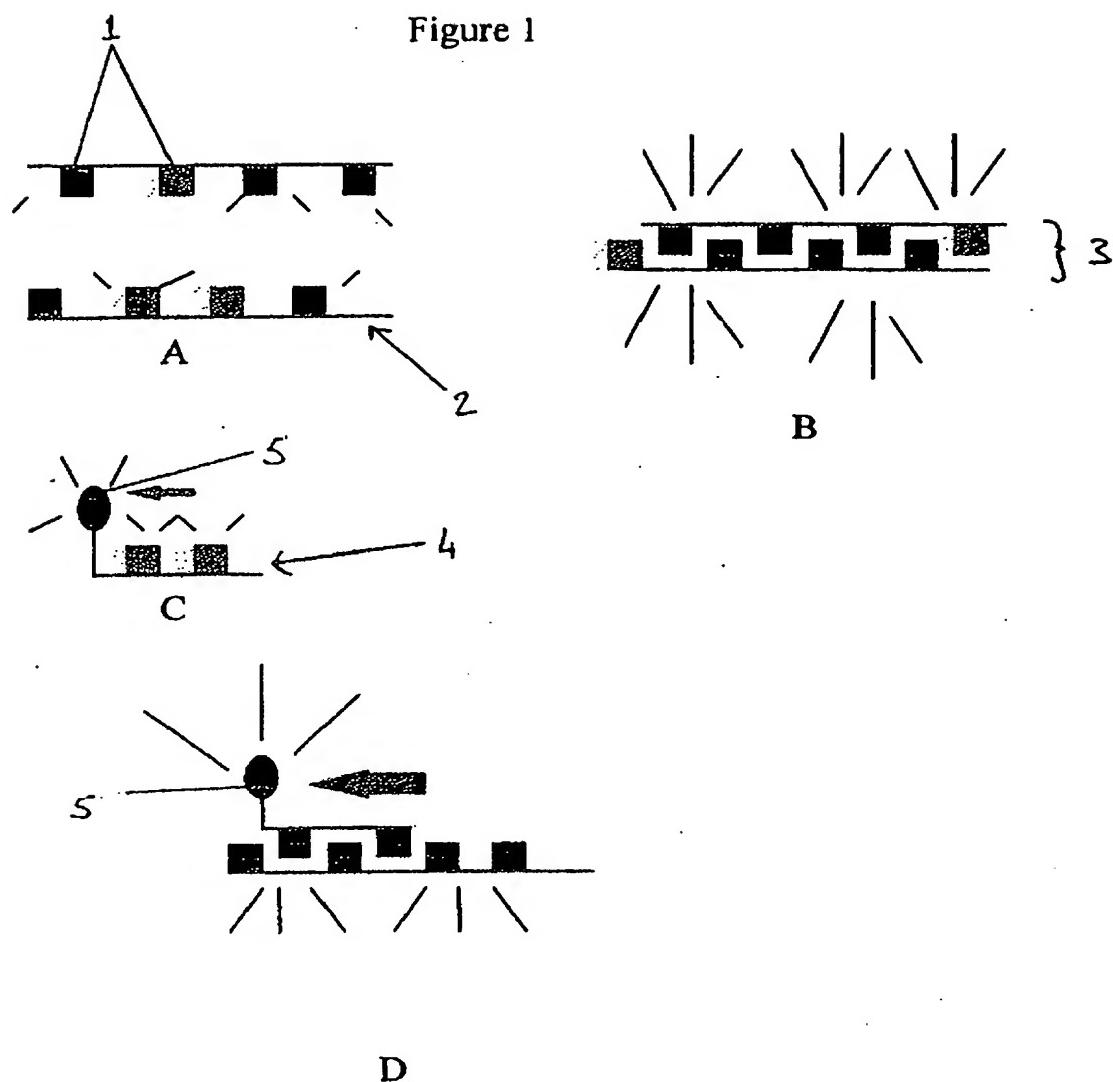
図 3 は本発明に従った增幅反応の結果を示す。

【 図 4 】

図 4 は配列内のミスマッチの検出のための実験の結果を示す。

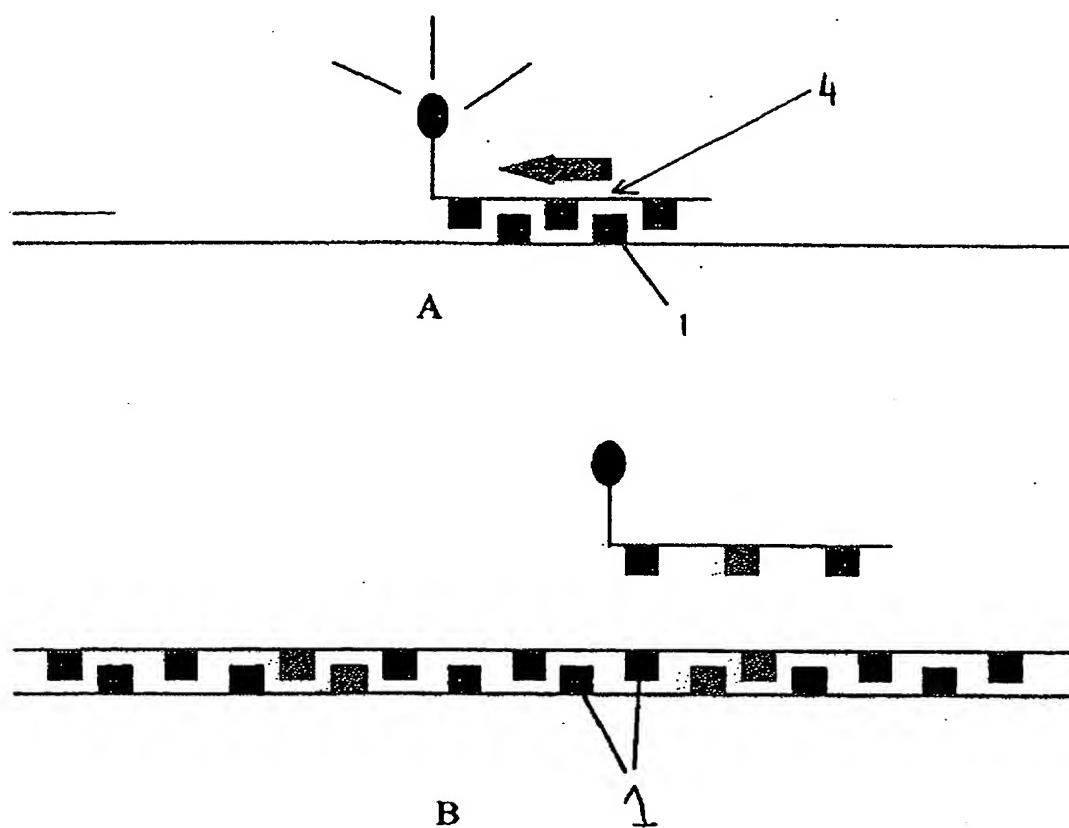
【図 1】

Figure 1

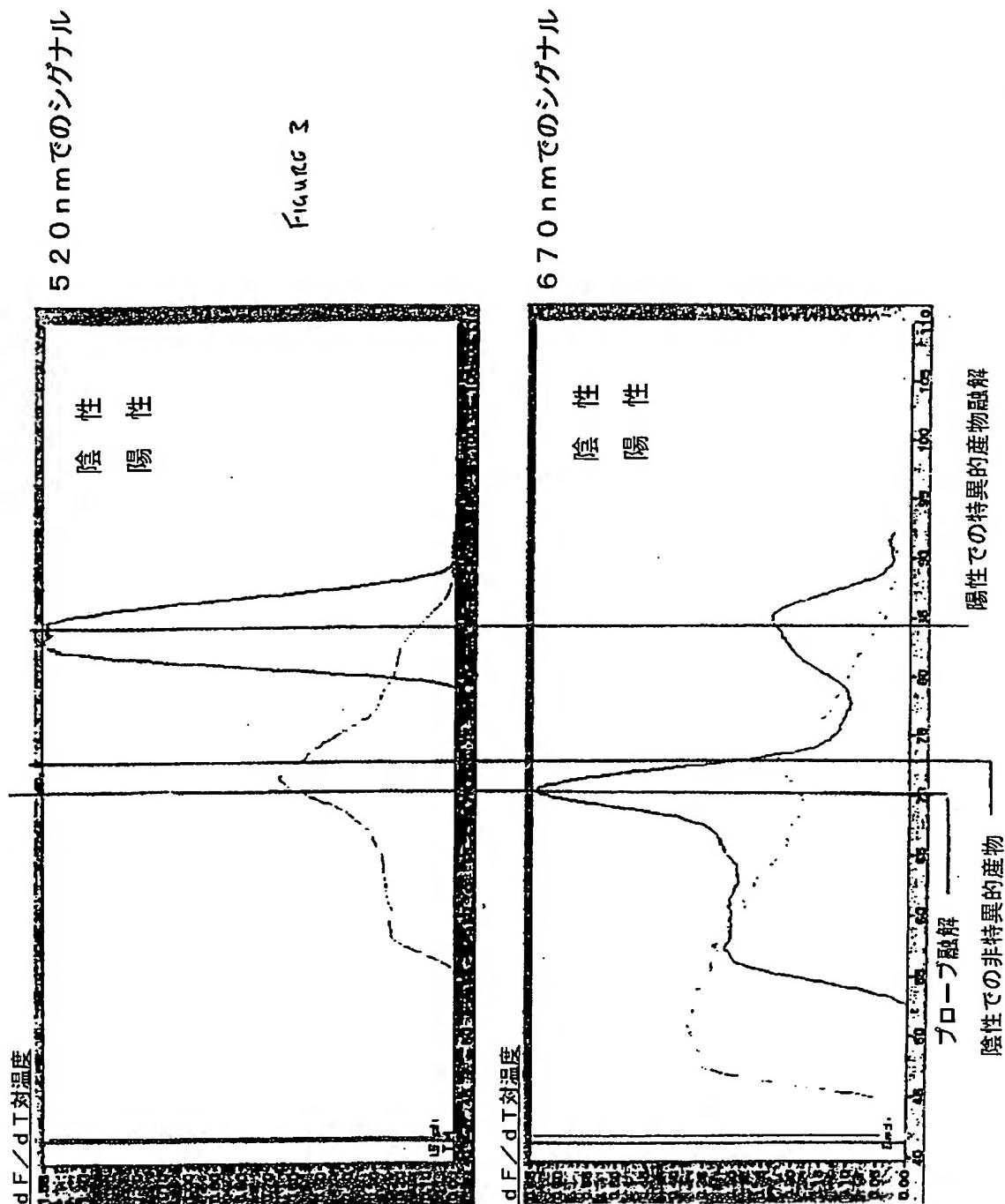


【図 2】

Figure 2

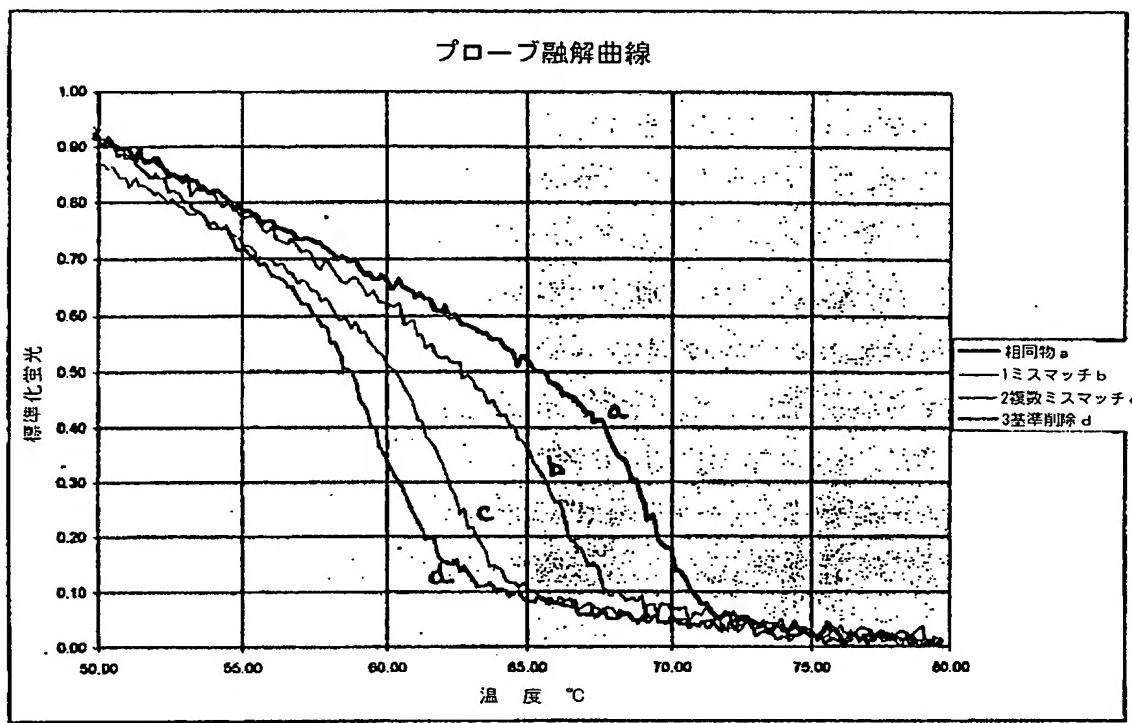


【図 3】



【図 4】

Figure 4



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年2月22日(2000.2.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 標的核酸配列を含むと推測されるサンプルに、DNA二重鎖結合剤、および該標的配列に特異的なプローブを添加し、該プローブは、該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収できるあるいはそれに蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、

(b) そのように作成した混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供し、

(c) 該サンプルを該プローブが標的配列にハイブリダイズする条件に供し、続いて標的配列から該プローブを完全な形のまま遊離し、および

(d) 該サンプルからの蛍光をモニターすることからなる、サンプル中の標的核酸分子の存在を検出する方法。

【請求項2】 プローブを含む二重鎖の形成および不安定化に関連した蛍光が決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 反応性分子が該DNA二重鎖結合剤から蛍光を吸収することが可能な受容体分子である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】 DNA二重鎖結合剤が挿入色素である、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項5】 段階(c)でのプローブへの結合以前に標的核酸が一本鎖化される、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項6】 増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項7】 増幅反応の各サイクル中にプローブが標的核酸とハイブリダイズする、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 8】 増幅サイクルの伸長期以外の期中にプローブが標的核酸とハイブリダイズする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 サンプルからの蛍光が増幅反応を通してモニターされる、請求項 7 または請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 生成された蛍光データが、反応中の供与体および受容体分子からの蛍光の相対的な量、またはプローブのハイブリダイゼーション率を決定するのに利用される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 蛍光データがサンプル中に存在する標的核酸の量を定量化するのに利用される、請求項 7 から 10 のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 12】 色素と反応性分子の両方からの蛍光がモニターされる、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 13】 反応性分子がローダミン色素、Cy5、またはフルオレセンスである、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 14】 反応性分子がプローブの末端領域に付着された、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 15】 プローブが増幅反応で利用される DNA ポリメラーゼによって加水分解されるように設計された、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 16】 増幅反応が 5' - 3' エキソヌクレアーゼ欠損酵素を利用して達成される、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 17】 プローブの 3' 末端が伸長期におけるその伸長を阻害するためにブロックされている、先行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 18】 (a) 核酸ポリメラーゼ、(b) 標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な少なくとも一つのプライマー、(c) 蛍光 DNA 二重鎖結合剤、および (d) 該標的ポリヌクレオチド配列に結合可能で、該 DNA 二重鎖結合剤から蛍光を吸収できる受容体分子を含むオリゴヌクレオチドプローブの存在下で、標的ポリヌクレオチドの核酸増幅を実施すること、および増幅反応中の蛍光の変化をモニターすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】 増幅が一対の増幅プライマーを用いて適切に実施される、

請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 核酸ポリメラーゼが適切に耐熱性のポリメラーゼである、  
請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】 さらなる段階において、ハイブリダイゼーションアッセイ  
が実施され、配列に特徴的なハイブリダイゼーション条件がモニターされる、先  
行する請求項のいずれかに一項に記載の方法。

【請求項 22】 条件が温度、電気化学ポテンシャル、または酵素あるいは  
化学薬品との反応である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 条件が温度である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】 標的配列の対立遺伝子変異または多型性を検出するのに利  
用される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】 ある配列の特徴を決定する方法であって、( a ) 該配列を  
含むと推測されるサンプルに、該標的配列に特異的なプローブ、および D N A 二  
重鎖結合剤を添加し、該プローブは、該 D N A 二重鎖結合剤から蛍光を吸収でき  
るあるいはそれに蛍光エネルギーを与えることができる反応性分子を含み、

( b ) 該サンプルを、該プローブが該配列にハイブリダイズする条件に供し、  
および

( c ) プローブのサンプルへのハイブリダイゼーションまたはプローブと標的  
核酸配列間に形成される二重鎖の不安定化の結果としての蛍光変化を該サンプル  
からモニターし、特異的反応条件、該配列の特徴を決定することからなる、配列  
の特徴を決定する方法。

【請求項 26】 該配列の反応条件の特徴が温度、電気化学ポテンシャル、  
または酵素あるいは化学薬品との反応である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 条件が温度である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】 多型性または変異の存在を決定するために、二つの配列か  
ら得られた結果を比較する、請求項 25 から 27 のいずれかに一項に記載の方法  
。

【請求項 29】 D N A 二重鎖結合剤が挿入色素である、請求項 25 から 2  
8 のいずれかに一項に記載の方法。

## [ 国際調査報告 ]

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/GB 98/03560

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 491 063 A (FISHER M. E. AND WATSON R. M.) 13 February 1996 cited in the application see column 3, line 22 - line 30 see column 8, line 23 - column 9, line 32; claims	1-15, 19-21, 31-34
X	WO 95 08642 A (ZENECA LTD) 30 March 1995  see page 14, line 21 - page 16, line 16; claims	1-14, 18-21, 31-34
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 April 1999		04/05/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax 31 651 epc nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Luzzatto, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/GB 98/03560

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 868 103 A (STAVRIANOPOULOS J. ET AL.) 19 September 1989 cited in the application see column 6, line 22 - line 28 see column 11, line 54 - column 12, line 34 see column 14, line 5 - column 17, line 58 see column 27, line 10 - column 28, line 60; claims -----	31,32,34
Y	EP 0 512 334 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE) 11 November 1992 see the whole document -----	1,26
Y	WO 97 12030 A (NANOGEN) 3 April 1997 see page 14, line 23 - page 15, line 2; figures 12,13 see page 38, line 25 - page 43, line 26; claims -----	26
2		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intell. and Application No  
PCT/GB 98/03560

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5491063	A	13-02-1996	EP JP	0699768 A 8070876 A	06-03-1996 19-03-1996
WO 9508642	A	30-03-1995	AU EP GB JP US	7662794 A 0720659 A 2283095 A, B 9503660 T 5827653 A	10-04-1995 10-07-1995 26-04-1995 15-04-1997 27-10-1998
US 4868103	A	19-09-1989	CA DE EP JP JP	1285330 A 3778958 A 0242527 A 2823119 B 62240864 A	25-06-1991 17-06-1992 28-10-1987 11-11-1998 21-10-1987
EP 512334	A	11-11-1992	AU AU CA CA EP JP JP NZ	665185 B 1513892 A 2067909 A 2218818 A 0872562 A 10201464 A 5184397 A 242565 A	21-12-1995 05-11-1992 03-11-1992 03-11-1992 21-10-1998 04-08-1998 27-07-1993 26-07-1994
WO 9712030	A	03-04-1997	US AU CA CN EP	5849486 A 6968996 A 2233238 A 1202929 A 0852617 A	15-12-1998 17-04-1997 03-04-1997 23-12-1998 15-07-1998

フロントページの続き

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, C Y,  
D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I  
T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J  
, C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L,  
M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K  
E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M  
, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M)  
, A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G,  
B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D  
K, E E, E S, F I, G B, G E, G H, G M, H R  
, H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G, K P,  
K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L  
V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z  
, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I,  
S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U  
S, U Z, V N, Y U, Z W

(72) 発明者 リー, マーテイン・アラン

イギリス国、ウイルトシャー・エス・ピ  
ー・4・0・ジエイ・ジー、ソールズベリ  
ー、ポートン・ダウン、シー・ビー・ディ  
ー (番地なし)

(72) 発明者 フュアスト, ロドリンク

イギリス国、ケンブリッジシャー・ピー・  
イー・18・0・エヌ・ジエイ、キンボルト  
ン、ハーバード・ウェイ、ザ・ビジネス・  
センター・6、バイオ/ジーン・ハウス、  
バイオ/ジーン・リミテッド

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB46 DA13 FA29 FB02  
FB07 FB12 GC15  
4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 HA11  
HA13 HA14  
4B063 QA01 QA05 QQ42 QR08 QR32  
QR38 QR42 QR56 QR62 QS25  
QS34 QS39 QX02